第2卷第4期增刊　　动 物 学 研 究　　Vol.2, No.4
1981年11月　　ZOOLOGICAL RESEARCH　　Nov., 1981

广东金环蛇细胞毒素XIII的化学组成和部分一级结构

张耀时　吴兴陆　陈远聪　　陈式穆
（中国科学院上海生物化学研究所）　　（暨南大学生物系）

摘　要

广东金环蛇蛇毒经CM-Sephadex C-50等分离、纯化后可得细胞毒素XIII。本文报导该毒素的氨基酸组成与部分一级结构。用LKB4020固相多肽顺序仪一次可连续测出该毒素N端部分的25个氨基酸顺序，其顺序为Asn(1)-Leu-Tyr-Gln-Phe(5)-Lys-Asn-Met-Ile-Glu(10)-Cys-Ala-Gly-Thr(15)-Arg-Thr-Trp-Ile-Ala-Tyr(20)-Val-Lys-Tyr-Gly-Ala(25)-·将该毒素乙酰化以后，可封闭它的N末端及侧链上的∈-氨基，在0.2M磷酸氢二钠溶液中，用胰蛋白酶在4°C消化18小时，能释放出一个新的N端，用手工Edman降解法可测出部分氨基酸顺序，其顺序为Lys-Thr-Tyr-Ala-Tyr-Thr·细胞毒素XIII的氨基酸组成与Lu Hsieng-sen和Lo Tung-bin报导的Miami金环蛇类心脏毒素VIB的氨基酸组成极为相似，但在一级结构上有明显差异。

在蛇毒细胞毒素中，绝大部分已知细胞毒素含有58～61个氨基酸，它们都是单链的蛋白质，在分子内含有4对二硫键。我们从广东金环蛇蛇毒中，分离、纯化了一个组分第XIII峰，我们称它为细胞毒素XIII.它由116个氨基酸残基组成，且含有6对二硫键。它的氨基酸组成与最近Lu Hsieng-sen和Lo Tung-bin发表的Miami金环蛇类心脏毒素VIB的组成[1]极为相似，也属于长链细胞毒素。本文报导该毒素的氨基酸组成及部分一级结构。

材料与方法

1.样品　金环蛇细胞毒素XIII即前文所述[2]分离的第XIII峰。在8M尿素的聚丙烯酰胺凝胶酸性电泳时为一条带。用2、4-二硝基氟苯（FDNB）方法及Edman降解法鉴定N-末端为一点。

2.化学试剂　二甲基烯丙基胺（DMAA）为美国Pierce公司产品，顺序级；1-乙基-3(3-二甲基-氨基丙基）-羰二亚胺盐酸盐(EDC)；异硫氰酸甲酯（MITC）及氨丙基

玻璃（APG）为LKB ULTROPAC产品；N-甲基吗啉为英国Koch-Light厂产品，重蒸一次；二甲基甲酰胺（DMF），甲醇，吡啶，乙腈，苯，乙酸乙酯及二氯乙烷为上海试剂一厂产品，分析纯，重蒸一次；异硫氰酸苯酯（PITC）为中国科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂产品，重蒸一次；三氟乙酸（TFA）为上海有机氟研究所产品，重蒸一次；硅胶薄板为E. Merck厂产品，5554型，硅胶$60F_{254}$。

3.仪器　使用Hitachi 835型氨基酸自动分析仪测定样品的氨基酸组成；用LKB 4020固相多肽顺序仪测定样品的氨基酸排列顺序。

4.测定氨基酸顺序的方法

（1）整个金环蛇细胞毒素XIII分子在N端用PITC保护后，不经氧化或还原，直接用EDC缩合剂将它的C端羧基与载体APG的氨基连接，用LKB4020固相多肽顺序仪测定，每次Edman降解后，就切下一个苯胺噻唑啉酮氨基酸（ATZ-氨基酸），在含水酸性条件下转化为苯基乙内酰硫脲（PTH-氨基酸），可用硅胶薄板层析进行鉴定。

（2）为了避免难度很大的肽段分离工作，先将样品进行乙酰化。这时样品的α-氨基和侧链的∈-氨基都被乙酰基封闭掉，使用胰蛋白酶水解乙酰化样品时，仅能在精氨酸残基的羧端进行，若控制酶解条件，使只水解一个肽键，就能产生一个新的N端。从这个新的N端开始，就能进行新的顺序测定。

5.操作步骤

（1）金环蛇细胞毒素XIII的乙酰化——基本上按照Riordan和Vallee的方法[3]进行。20毫克样品溶于3毫升0.4*M*，pH9.5 DMAA缓冲液中；溶液在冰浴中不断搅拌，在半小时内滴加0.4毫升乙酸酐，并加入5 *N*氢氧化钠溶液使pH维持在8～9的范围内。反应完毕，溶液用Sephadex G-10去盐，冷冻干燥。

（2）金环蛇细胞毒素XIII与载体APG的连接——基本上按Beyreuther的方法[4]进行。5毫克样品溶于0.4毫升pH9.5 DMAA缓冲液中，加入10%PITC的乙腈溶液0.4毫升，通氮气后摇匀，50°C保温半小时。反应完毕用苯抽出过量的试剂，水相在50°C用氮气吹干，真空放置过夜。加3毫克EDC（溶于0.5毫升DMF中），室温放置五分钟后加载体APG150毫克，（载体先用pH5.0，1*M*吡啶-盐酸溶液洗三次，水洗五次，DMF洗一次）。37°C保温3小时并不时搅动，再在室温放置过夜。加入MITC及N-甲基吗啉各0.25毫升，混匀后在45°C保温40分钟，以封闭载体上剩余的氨基。将接上样品的载体用甲醇充分洗。再用乙酸乙酯洗二次，水泵减压抽干若干后，用LKB4020固相多肽顺序仪测定氨基酸顺序。

（3）手工Edman顺序测定——基本上按照Edman[5]和Peterson等人[6]的改进方法。100～300毫微克分子的蛋白样品放在一只带有磨口玻塞的10毫升玻璃离心管中，加入0.4毫升pH9.5 DMAA缓冲液，以及0.3毫升10%PITC的乙腈溶液，通入氮气后摇匀，在50°C反应30分钟，过量试剂用苯抽出（4×1.5毫升），水相在55°C用氮气吹干，加入0.5毫升无水三氟乙酸，通入氮气后，在50°C裂解10分钟，用氮气将三氟乙酸吹干，加入0.4毫升水，1毫升乙酸乙酯，摇匀后离心分相，抽出有机相后，再加入2×1毫升乙酸乙酯。如此抽提共三次，在水相中含有除去N端氨基酸残基的肽段，在55°C用氮气吹干后，可开始下一步Edman降解。有机相中含有产物苯胺基噻唑啉酮氨基酸（ATZ-

氨基酸），在氮气流中将有机相吹干，加入0.5毫升，1 N HCl，在80°C保温10分钟。此时ATZ-氨基酸转化成PTH-氨基酸。用乙酸乙酯抽提，除了PTH-精氨酸、组氨酸及半胱磺酸仍留在水相外，其他PTH-氨基酸都进入有机相，分别将有机相和水相用氮气吹干后，用硅胶薄板鉴定PTH-氨基酸。

（4）PTH-氨基酸的鉴定——从有机相所得的PTH-氨基酸，加乙酸乙酯一滴溶解后在硅胶薄板上点样。用溶剂系统1（氯仿：乙醇＝98：2）[7]展层后在254毫微米紫外灯下可鉴定PTH-脯氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸、色氨酸、甘氨酸、酪氨酸、赖氨酸及双-PTH-胱氨酸。用溶剂系统2（氯仿：乙醇：甲醇＝88.2：1.8：10）可鉴定PTH-苏氨酸、丝氨酸、谷氨酰胺、门冬酰胺、谷氨酸及门冬氨酸。从水相所得的PTH-氨基酸，用丙酮（含1％水）溶解后，点样于硅胶薄板上。用溶剂系统3（乙酸丁酯:异丙醇:吡啶:乙酸:水＝10：4：4：1：1）展层后用碘蒸气熏产生黄色斑点，可鉴定PTH-组氨酸、精氨酸及磺基丙氨酸，它们的R_f值依次为0.63，0.42，及0.33。在鉴定胱氨酸时，前半个胱氨酸分子经Edman降解后，通过它的二硫键仍与后半个胱氨酸分子相连接，所以在测定前半个胱氨酸分子时，在顺序上会出现一个空缺，当测定到后半个胱氨酸分子时，经Edman降解后可形成双PTH-胱氨酸。

（5）固相多肽顺序仪的操作——用单柱顺序卡片控制。PITC与肽链的氨基在pH 8.4，50°C反应32分钟。TFA的裂解反应在50°C进行10分钟。每降解一个氨基酸共需80分钟。产物苯胺基噻唑啉酮氨基酸（ATZ-氨基酸）用部分收集器收集后，用手工方法将ATZ-氨基酸转化成PTH-氨基酸。再用硅胶薄板层析法进行鉴定。

（6）样品的酸水解及氨基酸组成分析——样品用5.7N盐酸（含4％巯基乙酸）于110°C水解24小时，除去盐酸后，以0.02N盐酸溶解。在HItachi835-型氨基酸自动分析仪上测定氨基酸组成。

结果与讨论

广东金环蛇细胞毒素XIII的氨基酸组成表明它是由116个氨基酸残基组成，其中含有6个胱氨酸，14个芳香族氨基酸，22个酸性氨基酸，15个碱性氨基酸。由于整个毒素分子呈碱性，所以有相当数量的酸性氨基酸是以酰胺的形式存在于分子中。

该细胞毒素与昆明动物研究所、北京生物物理研究所发表的金环蛇类心脏毒素B的氨基酸组成[8]有相当程度的差异。与Lu Hsieng-sen和Lo Tung-bin发表的Miami金环蛇类心脏毒素VIB的氨基酸组成[1]极为相似，仅差二个氨基酸残基。见表1。

使用LKB4020固相多肽顺序仪一次可连续测出该毒素N端部分的25个氨基酸顺序。发现该顺序与Lu Hsieng-sen和Lo Tung-bin报导的Miami金环蛇类心脏毒素VIB的氨基酸顺序[1]自第1位至15位完全一致。但自第16位开始出现差别。见表2。

将该毒素乙酰化以后可封闭它的N末端氨基及侧链上的∈-氨基，在0.2M磷酸氢二钠溶液中，用胰蛋白酶在4°C消化18小时，则能释放出一个新的N末端。用手工Edman降解法测得其部分顺序，与Lu Hsieng-sen和Lo Tung-bin报导的Miami金环蛇类心脏毒素VIB的部分氨基酸顺序[1]（第73～78位）绝大部分相同。在这段顺序中，仅差一个氨

表一 金环蛇细胞毒素XIII与金环蛇类心脏毒素B及VIB的氨基酸组成的比较

氨基酸	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	1/2Cys	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg	Trp
细胞毒素XIII	16	10	1	6	5	11	11	12	3	1	5	6	9	4	9	3	3	1
类心脏毒素B[8]	17	8	1	7	2	10	11	18	3	1	4	6	8	5	15	3	3	2
类心脏毒素VIB[1]	16	10	1	7	5	11	11	12	3	1	5	6	9	4	9	3	4	1

表二 金环蛇细胞毒素XIII与金环蛇类心脏毒素VIB的N端部分氨基酸顺序比较

细胞毒素XIII	1 Asn-Leu-Tyr-Gln-5 Phe-Lys-Asn-Met-Ile-10 Glu-Cys-Ala-Gly-Thr-15 Arg-[Thr-Trp-Ile-Ala-20 Tyr-Val-Lys-Tyr-Gly-] 25 Ala------Lys-Thr-Tyr-[Ala-]Tyr-Thr----
类心脏毒素VIB[1]	1 Asn-Leu-Tyr-Gln-5 Phe-Lys-Asn-Met-Ile-10 Glu-Cys-Ala-Gly-Thr-15 Arg-[Asn-Ile-Ala-Gly-20 Phe-Thr-Asn-Trp-Gln] 25 -Ala-----73 Lys-Thr-Tyr-[Val-]78 Tyr-Thr----

基酸残基。前者为丙氨酸，在后者则为糊氨酸。

该毒素的全部氨基酸顺序测定还未完成，目前只测定了全部顺序的四分之一左右。它的氨基酸组成虽与Lu Hsieng-sen和Lo Tung-bin发表的Miami金环蛇类心脏毒素VIB的组成极为相似，仅差2个氨基酸残基，但在部分一级结构上已有明显差别。这就很有必要将该毒素的全部一级结构进一步搞清楚。更值得指出的是该毒素的分子量在13,000左右，属于长链细胞毒素，这在蛇毒的细胞毒素中是较罕见的。研究该毒素的结构与功能的关系确是很有意义的。

参 考 文 献

〔1〕 Lu, H.S. and Lo, T.B. Complete amino acid sequence of a new type of cardiotoxin of *Bungarus fasciatus* venom. *Int. J.Peptide Protein Res.*, 1978, 12, 181.

〔2〕 陈式穆、吴兴陆、张孝慈、陈远聪：金环蛇毒毒性组分的分离、纯化与鉴定。生物化学与生物物理学报，1981，待发表.

〔3〕 Riordan, J.F. and Vallee, B.L. Acetylation. *Methods in Enzymology.* 1967, XI, 565, Hirs, C.H.W. (ed.), Academic Press, New York and London.

〔4〕 Beyreuther, K. Solid phase methods in protein sequence analysis. *INSERM symposium*, 1977, No. 5, 107—119. Previero, A. and Coletti-Previers, M.S. (ed.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

〔5〕 Edman, P. *Protein Sequence Determination.* 1970, p.211, Needleman, S.B., (ed.), Springer, Berlin-Heidelberg-New York.

〔6〕 Peterson, J.D. et al. Determination of the amino acid sequence of the monkey, sheep, and dog proinsulin C-peptides by a semi-micro Edman degradation procedure. *J.Biol. Chem.*, 1972, 247, 4866.

〔7〕 Bridgen, J. et al. The identification of PTH-amino acid. *Instrumentation in Amino Acid Sequnce Analysis.* 1975, p.111, Academic Press, London.

〔8〕 肖昌华、张洪基、雷克健：金环蛇蛇毒类心脏毒素的纯化及生化分析，动物学研究，1981，2，49。

志谢：对陈志民同志的氨基酸组成分析和綦见风同志参加的部分顺序测定工作一并致谢。

THE AMINO ACID COMPOSITION AND PARTIAL SEQUENCE OF CYTOTOXIN XIII FROM CANTON *BUNGARUS FASCIATUS* VENOM

Zhang Yao-shi, Wu Shin-lu, Chen Yuan-chung
(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia sinica)

Chen Shi-qiu
(Department of Biology, Jinan University)

Abstract

1. The amino acid composition and partial sequnce of cytotoxin XIII from the venom of Canton Bungarus fasciatus were determined.

2. The amino acid composition of this cytotoxin XIII is very similar with that of the cardiotoxin-like VI B which was purified from the venom of Miami Bungarus fasciatus.

3. The initial 15 steps of the N-terminal amino acid sequence of this cytotoxin XIII were identical with that of cardiotoxin-like VI B and the difference between them was appeared from the sixteenth step on. The sequences of these two fragments were 1). $\overset{1}{\text{Asn}}$-Leu-Tyr-Gln-$\overset{5}{\text{Phe}}$-Lys-Asn-Met-Ile-$\overset{10}{\text{Glu}}$-Cys-Ala-Gly-Thr-$\overset{15}{\text{Arg}}$-Thr-Trp-Ile-Ala-$\overset{20}{\text{Tyr}}$-Val-Lys-Tyr-Gly-$\overset{25}{\text{Ala}}$。2).-Lys-Thr-Tyr-Ala-Tyr-Thr-.